

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



Socket NO. HNR 2053 USNP  
S/N 09/933,780

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : <b>A61K 47/48</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/32236</b> (43) Date de publication internationale: 8 juin 2000 (08.06.00)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02938 (22) Date de dépôt international: 26 novembre 1999 (26.11.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/15074 30 novembre 1998 (30.11.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SYNT:EM (S.A.) [FR/FR]; Parc Scientifique Georges Besse, F-30000 Nîmes (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CLAIR, Philippe [FR/FR]; 54, impasse des Chasseurs, Chemin des Terres de Rouvière, F-30000 Nîmes (FR). KACZOREK, Michel [FR/FR]; 81, boulevard de la Lironde, F-34980 Montferrier sur Lez (FR). TEMSAMANI, Jamal [FR/FR]; Résidence de l'Empereur, Bâtiment B, 26, chemin des Carrières, F-30900 Nîmes (FR). (74) Mandataires: BREESE, Pierre etc.; Breese-Majerowicz, 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>
<p>(54) Title: PEPTIDES CARRYING SUBSTANCES ACROSS THE BLOOD BRAIN BARRIER (54) Titre: VECTEURS PEPTIDIQUES DE SUBSTANCES A TRAVERS LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE (57) Abstract The invention concerns the use of a linear peptide paired with an active substance for diagnosing or treating a CNS pathology by preparing a medicine capable of crossing the blood brain barrier to be used for diagnosis or treatment of a pathology localised in the CNS. (57) Abrégé La présente invention concerne l'utilisation d'un peptide linéaire couplé à une substance active en diagnostic ou thérapie d'une affection du SNC pour la préparation d'un médicament capable de traverser la barrière hémato-encéphalique à utiliser en diagnostic ou thérapie d'une affection localisée au niveau du SNC.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Caméroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

VECTEURS PEPTIDIQUES DE SUBSTANCES A TRAVERS LA  
BARRIERE HEMATOENCEPHALIQUE

5

La présente invention concerne l'utilisation des peptides comme vecteurs pour le transfert de molécules actives à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) pour des applications en thérapie et en diagnostic.

10

Le problème majeur dans le traitement de nombreuses maladies du système nerveux central réside dans le fait que les molécules administrées ne passent pas la barrière hémato-encéphalique et ne peuvent donc pas atteindre leur cible dans le cerveau.

15

Les cellules endothéliales qui constituent la BHE font obstacle, de diverses manières, aux molécules qui tentent de les franchir. En effet, ces cellules endothéliales constituent une barrière physique représentée par les jonctions étanches qui relient entre elles et empêchent tout passage par la voie paracellulaire et ce, d'autant plus que l'activité d'endocytose y est faible, ce qui limite fortement le passage des substances du plasma vers l'espace extracellulaire cérébral.

20

Une des priorités de la recherche dans ce domaine, est donc de trouver des moyens permettant d'augmenter l'efficacité de passage des substances actives à travers la BHE. Plusieurs stratégies ont été développées pour augmenter le passage de ces substances à travers la BHE (Pardridge, 1994, Tibtech 12, 239-245 ; Tamai et al., 1996, Adv. Drug Del. Rev. 19, 401-424).

25

30

Trois stratégies principales ont été proposées pour le transport de molécules à travers la BHE, une stratégie neurochirurgicale, une stratégie pharmacologique pour les petites molécules et une stratégie physiologique.

35

La stratégie neurochirurgicale peut être mise en œuvre par infusion intraventriculaire de la substance active, par thérapie cellulaire, et par perturbation de la BHE. L'infusion intraventriculaire implique le placement

d'un cathéter dans les ventricules (Aird, 1984, Exp. Neurol. 86, 342-358). Cette technique est très invasive et n'est pas efficace pour le transport de substances actives dans le parenchyme. La perturbation de la BHE cause une ouverture transitoire des jonctions serrées, cas des substances vasoactives comme les leukotriènes ou bradykinines (Baba et al., 1991, J. Cereb. Blood Flow Metab. 11, 638-643). Cette stratégie est également invasive et nécessite un accès artériel chez les sujets sous sédatifs. En outre, la perturbation répétitive de la BHE peut conduire à des changements neuropathiques (Salahuddin et al., 1988, Acta Neuropathol. 76, 1-10).

La stratégie pharmacologique pour le transport de petites molécules comprend l'addition de groupements lipidiques et l'utilisation des liposomes (Zhou et al., 1992, J. Controlled Release 19, 459-486). L'addition d'un groupement lipidique permet la conversion chimique des molécules solubles dans l'eau en molécules solubles dans les lipides. Cependant, la synthèse de tels produits conduit à des molécules qui dépassent le seuil de transport. Les molécules doivent avoir un poids moléculaire de moins de 600d pour traverser la BHE. Pour cette raison, les liposomes ou même les petites vésicules sont trop grandes et par conséquent inefficaces pour le transport à travers la BHE (Levin, 1980, J. Med. Chem. 23, 682-684 ; Schackert et al., 1989, Selective Cancer Ther. 5, 73-79).

La stratégie physiologique fait appel à un système de transport récepteur-dépendent. La molécule à transporter est couplée à une molécule biologique qui possède un récepteur au niveau de la BHE. Par exemple, la transferrine possède un récepteur au niveau de la BHE et peut être utilisée comme vecteur (Jeffries et al., 1984, Nature 312, 162-163 ; Friden et al., 1983, Science 259, 373-377 ; Friden, 1994, Neurosurgery 35, 294-298). Bien que cette stratégie permette une augmentation du passage des molécules à travers la BHE, elle présente quelques inconvénients. D'abord, le couplage de la molécule au vecteur se fait par des méthodes d'expression génétique limitant ainsi le nombre de molécules à transporter à

seulement des polypeptides ou des protéines. Ensuite, le système de couplage de la molécule au vecteur est compliqué.

5 La présente invention vise donc à palier ces inconvénients en utilisant des peptides pour vectoriser des substances à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette approche offre plusieurs avantages. Tout d'abord, le peptide vecteur est synthétisé par voie chimique. De plus, la plupart des molécules médicamenteuses (molécules  
10 conventionnelles, peptides, protéines, oligonucléotides) peuvent être couplées au vecteur de façon simple et efficace.

15 Il a été décrit dans l'art antérieurs de nombreux peptides capables de traverser les membranes des cellules eucaryotes de manière très rapide et tels que les peptides suivants : Protégrine, Antennapedia, Tachyplésine, Transportan, etc....

20 Parmi ceux-ci, certains présentent des propriétés cytolytiques. Ces peptides dénommés peptides antibiotiques sont notamment les Protégrines et Tachyplésines. Les Protégrines et Tachyplésine sont des peptides antibiotiques naturels dont la structure est de type épingle à cheveux maintenue par des ponts disulfures.  
25 Ces ponts jouent un rôle important dans l'activité cytolytique observée sur cellules humaines.

Selon leur structure, les peptides antibiotiques peuvent être classés en trois grandes familles :

30 - Les peptides antibiotiques à hélices alpha amphipatiques : cécropines et maganines (Maloy, W. L. et al., 1995, BioPolymer 37, 105-122).

35 - Les peptides antibiotiques à feuillet bêta réunis par des ponts disulfures : défensines (Lehrer, R. I. et al., 1991, Cell 64:229-230 ; Lehrer, R. I. et al., 1993, Ann. Rev. Immunol. 11:105-128), protégrines (Kokryakov, V. N. et al., 1993, FEBS 337:231-236), tachyplésines (Nakamura, T. et al., 1988, J. Biol. Chem. 263:16709-16713 ; Miyata, T et al., 1989, J. Biochem. 106:663-668).

- les peptides antibiotiques à chaînes déstructurées contenant de nombreux coudes liés à la présence de multiples prolines : bacténécines et PR39 (Frank, R. W. et al., 1991, Eur. J. Biochem. 202, 849-854).

On désigne sous le nom de protégrines un ensemble de cinq peptides désignés PG-1, PG-2, PG-3, PG-4 et PG-5 dont les séquences sont données ci-dessous, étroitement apparentés et isolés de leucocytes de porc (V.N. Kokryakov & col. FEBS lett. 327, 231-236) :

PG-1 : RGGRLCYCRRRFCVCVGR-NH<sub>2</sub>

PG-2 : RGGRLCYCRRRFCICV..-NH<sub>2</sub>

PG-3 : RGGGLCYCRRRFCVCVGR-NH<sub>2</sub>

PG-4 : RGGRLCYCRGWICFCVGR-NH<sub>2</sub>

PG-5 : RGGRLCYCRPRFCVCVGR-NH<sub>2</sub>

Les tachyplésines (Tamura, H. et al., 1993, Chem. Pharm. Bul. Tokyo 41, 978-980), désignées T1, T2 et T3 et les polyphémusines (Muta, T., 1994, CIBA Found. Sym. 186, 160-174), désignées P1 et P2, dont les séquences sont données ci-dessous, sont des peptides homologues isolés de l'hémolymphe de deux crabes, *Tachypleus tridentatus* pour les tachyplésines T1, T2 et T3 et *Limulus polyphemus* pour les polyphémusines P1 et P2 :

P1 : RRWCFRVCYRGFCYRKCR-NH<sub>2</sub>

P2 : RRWCFRVCYKGFYRKCR-NH<sub>2</sub>

Protégrines, tachyplésines et polyphémusines contiennent une forte proportion de résidus basiques (lysines et arginines) et possèdent quatre cystéines qui forment deux ponts disulfures parallèles. Ces trois familles de peptides présentent également des homologies avec certaines défensines et en particulier avec la défensine humaine NP-1 (Kokryakov, V. N. et al., 1993, Febs Let. 327, 231-236).

Ainsi, dans le cadre de ces travaux de recherche, la Demanderesse a découvert que la réduction irréversible de ces ponts disulfures permet d'obtenir des peptides linéaires, désignés ci-après aussi "Pégélines" ayant la capacité de traverser rapidement les membranes des cellules de mammifères par un mécanisme passif ne faisant pas appel à un récepteur membranaire. Ces peptides linéaires

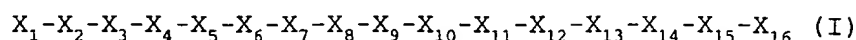
sont non-toxiques et sans activité lytique, et en conséquence, ils constituent un nouveau système de vectorisation de substances actives dans les domaines thérapeutique ou diagnostic. Les travaux et résultats concernant ces peptides linéaires et leur utilisation comme vecteur de substances actives sont décrits dans la demande de brevet français de la Demanderesse déposée le 12 Août 1998 sous le No. 97/10297 dont l'enseignement est incorporé ici par référence.

Les peptides issus de la famille Antennapedia sont des dérivés du facteur de transcription de l'homéodomaine Antennapedia de la mouche drosophile et sont par exemple décrits dans les demandes de brevet internationales PCT publiées sous les No. WO91/18981 et WO97/12912. La séquence de ces peptides présente la particularité d'être hautement conservée dans toutes les homéoprotéines. Ces peptides sont composés de trois hélices alpha et sont capables de se transloquer au travers de la membrane cellulaire. Le plus petit fragment de l'homéodomaine capable de traverser les membranes est un peptide de 16 acides aminés (Prochiantz, 1996, Curr. Opin. In Neurob. 6, 629-634 ; Derossi et al., 1994, J. Biol. Chem. 269, 10444-10450).

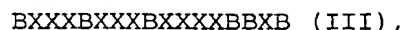
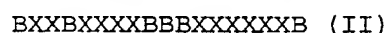
Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de la présente invention ont maintenant permis à la Demanderesse de montrer que certains de ces peptides linéaires, c'est à dire dépourvus de pont disulfure, peuvent être utilisés comme système de vectorisation très efficace permettant de faire traverser la BHE à une substance active en diagnostic ou thérapie d'une affection du système nerveux central (SNC).

L'invention concerne donc plus particulièrement l'utilisation d'un peptide linéaire couplé à une substance active en diagnostic ou thérapie d'une affection du SNC pour la préparation d'un médicament capable de traverser la barrière hématoencéphalique à utiliser en diagnostic ou

thérapie d'une affection localisée au niveau du SNC, ledit peptide répondant à l'une des formules (I), (II) ou (III) suivantes :



5 dans laquelle formule (I), les résidus  $X_1$  à  $X_{16}$  sont des résidus d'acides aminés dont 6 à 10 d'entre-eux sont des acides aminés hydrophobes et  $X_6$  est le tryptophane,



10 dans lesquelles formules (II) et (III) :

- les groupes B, identiques ou différents, représentent un résidus d'acide aminé dont la chaîne latérale porte un groupement basique, et

15 - les groupes X, identiques ou différents, représentent un résidus d'acide aminé aliphatique ou aromatique,

ou lesdits peptides de formules (I), (II), (III) sous forme rétro, constitués d'acides aminés de configuration D et/ou L, ou un fragment de ceux-ci  
20 constitué d'une séquence d'au moins 5 et de préférence d'au moins 7 acides aminés successifs des peptides de formules (I), (II) ou (III) dès lors bien entendu que ce fragment présente les propriétés de vectorisation sans toxicité pour les cellules.

25 Les peptides de formule (I) dérivent de la famille Antennapedia. Dans les peptides de formules (I), les acides aminés hydrophobes sont l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, le tryptophane, la tyrosine et la méthionine, et les autres  
30 acides aminés sont des acides aminés :

- non-hydrophobes qui peuvent être des acides aminés non polaire comme la glycine, ou polaires comme la sérine, la thréonine, la cystéine, l'asparagine, la glutamine, ou

35 - acides (acide aspartique ou glutamique), ou  
- basiques (lysine, arginine ou histidine), ou  
- une association d'acides aminés de ces trois catégories.



Parmi les peptides de formule (I), on préfère ceux comprenant 6 acides aminés hydrophobes et 10 acides aminés non-hydrophobes.

5 Les peptides linéaires de formule (II) dérivent de la famille Protégrine et les peptides linéaires de formule (III) dérivent de la famille Tachyplésine. Parmi les peptides de formules (II) et (III), on préfère ceux dans lesquels :

10 - B est choisi parmi l'arginine, la lysine, l'acide diaminoacétique, l'acide diaminobutyrique, l'acide diaminopropionique, l'ornithine, et

- X est choisi parmi la glycine, l'alanine, la valine, la norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la cystéine<sup>Acm</sup>, la penicillamine, la méthionine, le serine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la phénylalanine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine, la proline, l'Abu, l'acide amino-1-cyclohexane carboxylique, l'Aib, la 2-aminotétraline carboxylique, la 4-bromophénylalanine, tert-Leucine, la 4-chlorophénylalanine, la bêta-cyclohexy alanine, la 3,4-dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine, l'homoleucine, la bêta-homoleucine, l'homophénylalanine, la 4-méthylphénylalanine, la 1-naphty alanine, la 2-naphty alanine, la 4-nitrophénylalanine, la 3-nitrotyrosine, la norvaline, la phénylglycine, la 3-pyridy alanine, la [2-thiényl]alanine.

20 Dans les peptides de formules (I), (II) ou (III), B, X et X<sub>1</sub> à X<sub>16</sub> peuvent être des acides aminés naturels ou non, y compris des acides aminés de configuration D.

30 Des peptides préférés utilisés selon l'invention sont choisis parmi ceux dont les séquences en acides aminés sont les suivantes :

35 - RGGRLSYSRRRFSTSTGR, désigné aussi ci-après SynB 1  
- RRLSYSRRRF, désigné aussi ci-après SynB 3  
- rqi kiw i q n r r m k w k k

où les lettres minuscules représentent des acides aminés sous forme d.

5 Le couplage de la substance active et d'un peptide défini ci-dessus dans les compositions de l'invention peut être réalisé par tout moyen de liaison acceptable compte tenu de la nature chimique, de l'encombrement et du nombre de substance active et de peptide associés. Il peut s'agir de liaisons covalentes, 10 hydrophobes ou ioniques, clivables ou non-clivables dans les milieux physiologiques ou à l'intérieur de la cellules.

Le couplage peut être effectué en n'importe quel site du peptide, dans lequel des groupements fonctionnels tels que -OH, -SH, -COOH, -NH<sub>2</sub> sont naturellement présents 15 ou ont été introduits. Ainsi, un agent anti-cancéreux peut être lié au peptide au niveau des extrémités N-terminale ou C-terminale ou bien au niveau des chaînes latérales du peptide.

De même, le couplage peut être effectué en 20 n'importe quel site de la substance active, où par exemple des groupements fonctionnels tels que -OH, -SH, -COOH, -NH<sub>2</sub> sont naturellement présents ou ont été introduits.

Ainsi, l'invention se rapporte tout 25 particulièrement à l'utilisation de composés répondant à la formule (IV) suivante :

$A (-)_m (B)_n$  (IV)

dans laquelle

30 - A représente un peptide tel que défini précédemment,

- B représente une substance active en diagnostic ou thérapie d'une affection du SNC,

- n est 1 ou plus, et de préférence jusqu'à 10 avantageusement jusqu'à 5,

35 -  $(-)_m$  représente la liaison, ou linker, entre A et B, où m est 1 ou plus, et de préférence jusqu'à 10 avantageusement jusqu'à 5,

pour la préparation d'un médicament capable de traverser la barrière hématoencéphalique à utiliser en

diagnostic ou thérapie d'une affection localisée au niveau du SNC.

Dans la formule (IV) la liaison  $(-)_m$  entre A et B est une liaison covalente, hydrophobe ou ionique, clivable ou non-clivable dans les milieux physiologiques ou à l'intérieur de la cellules, ou un mélange de celles-ci.

Les composés de formule (IV) peuvent être préparés par synthèse chimique ou en utilisant des techniques de biologie moléculaire.

On peut utiliser pour les synthèses chimiques des appareils commerciaux permettant d'incorporer des acides aminés non-naturels, tels que les énantiomères D et des résidus ayant des chaînes latérales ayant des hydrophobicités et des encombrements différents de ceux de leurs homologues naturels. Au cours de la synthèse, il est évidemment possible de réaliser un large éventail de modifications, par exemple introduire sur le N-terminal un lipide, par exemple prenyl ou myristyl, de façon à pouvoir ancrer le peptide de l'invention et donc le composé de formule (IV) à une membrane lipidique telle que celle d'un liposome constitué de lipides. Il est également possible de remplacer une ou plusieurs liaisons peptidiques  $(-CO-NH-)$  par des structures équivalentes comme  $-CO-N(CH_3)-$ ,  $-CH_2-CH_2-$ ,  $-CO-CH_2-$ , ou bien d'intercaler des groupes comme  $-CH_2-$ ,  $-NH-$ ,  $-O-$ .

On peut également obtenir les composés de formule (IV) ou partie de ceux-ci de nature protéique à partir d'une séquence d'acide nucléique codant pour celui-ci. La présente invention a aussi pour objet une molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour un peptide linéaire dérivé de peptide antibiotique. Plus particulièrement l'invention concerne une molécule d'acide nucléique comprenant au moins une séquence codant pour un composé de formule (IV) ou une partie de celui de nature protéique. Ces séquences d'acides nucléiques peuvent être des ADN ou ARN et être associées à des séquences de contrôle et/ou être insérées dans des vecteurs. Le vecteur utilisé est choisi en fonction de l'hôte dans lequel il sera transféré; il peut s'agir de tout vecteur

comme un plasmide. Ces acides nucléiques et vecteurs sont utiles pour produire les peptides et les composés de formule (IV) ou partie de ceux-ci de nature protéique dans un hôte cellulaire. La préparation de ces vecteurs ainsi que la production ou l'expression dans un hôte des peptides ou des composés de formule (IV) peuvent être réalisées par les techniques de biologie moléculaire et de génie génétique bien connues de l'homme du métier.

Les compositions contenant des composés de formule (IV) et avantageusement un véhicule pharmaceutiquement acceptable peuvent être administrées par différentes voies comme par exemple de manière non limitative, les voies intraveineuse, intramusculaire, sous cutanée, etc....

Les peptides de formule (I), (II) ou (III) permettent de faire traverser la barrière hématoencéphalique à une substance active qui ne passe pas ou peu cette barrière. Ils peuvent donc être utilisés, comme proposé précédemment dans le traitement, la prévention ou le diagnostic d'une maladie affectant le SNC, mais aussi dans le cadre d'études menées sur des drogues diverses avec des modèles de barrière hématoencéphalique.

A titre de substance active, l'invention envisage notamment des protéines, comme des polypeptides ou peptides, des anticorps ou partie d'anticorps, des acides nucléiques et oligonucléotides ou des ribozymes, ou encore, bien entendu des molécules chimiques actives pour le traitement ou la prévention de pathologies humaines ou animales du SNC, comme par exemple et de manière non limitative des antitumoraux, des antiviraux, des antidépresseurs, des analgésiques, etc... .

Dans le domaine du diagnostic, la substance active peut être un marqueur radioactif, un marqueur coloré, ou tout autre moyen ou substance capable de révéler un métabolisme ou une pathologie du SNC.

Les affections du SNC, dont le diagnostic, le traitement ou la prévention sont envisagés dans le cadre de la présente invention sont par exemple de manière non limitative, les cancers du cerveau, la maladie d'Alzeihmer, la maladie de Parkinson, la dépression, la douleur, les méningites, etc....

L'invention concerne donc tout particulièrement l'utilisation des composés de formule (IV) pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'une affection choisie parmi : les cancers du cerveau, la maladie d'Alzeihmer, la maladie de Parkinson, la dépression, la douleur, les méningites.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent concernant la préparation de composés de formule (IV) où la substance active est la doxorubicine, la dalargine, la penicilline et leur pénétration dans le cerveau conformément à l'utilisation de peptides linéaires selon l'invention.

#### Exemple I : Pénétration de la doxorubicine.

##### I - Conditions expérimentales.

###### 1) Synthèse Chimique.

Plusieurs peptides ont été synthétisés et leur internalisation a été testée dans plusieurs lignées cellulaires. De façon générale, les propriétés physico-chimiques des peptides ont été modifiées, et les résultats obtenus montrent que suivant la modification, certains peptides pénètrent beaucoup mieux que d'autres, comme les peptides des composés No. 1 et 2 du tableau I ci-après. Il a également été observé que certains peptides pénètrent plus rapidement dans un type cellulaire que dans d'autres, ce qui indique un tropisme cellulaire.

###### a) Préparation de Doxorubicine-Succ-Peptides.

Le couplage de la doxorubicine sur un peptide par l'intermédiaire du maillon succinique est effectué en 3 étapes comme montré sur la figure 1 en annexe.

5           Au chlorhydrate de doxorubicine (1 eq), solubilisé dans diméthylformamidine (DMF) en présence de Disopropyléthylamine (DIEA, 2 eq) est ajouté l'anhydride succinique (1,1eq, dissous dans DMF).

10           Après une incubation de 20 min à température ambiante, l'hémisuccinate de doxorubicine ainsi formé est ensuite activé par addition de PyBOP (Benzotriazol-1-yl-oxopyrrolidinephosphonium Hexafluorophosphate 1,1eq dans DMF) et DIEA (2 eq). Ce second mélange réactionnel est incubé 20 min.

15           Le peptide (1,2 eq dans DMF) est ensuite ajouté au mélange réactionnel, et se couple spontanément sur l'hémisuccinate de doxorubicine activé au cours d'une incubation supplémentaire de 20 min.

20           Le produit de couplage est ensuite purifié sur HPLC (Chromatographie liquide haute pression) préparative, puis lyophilisé.

          Chacune des étapes, ainsi que le produit final sont contrôlés par HPLC analytique et spectrométrie de masse.

25           b) Préparation de Doxorubicine-SMP-3MP-Peptide.

          Le couplage de la doxorubicine sur un peptide porteur de fonction thiol est effectué en 2 étapes comme montré sur la figure 2 en annexe.

30           Au chlorhydrate de doxorubicine (1 eq), solubilisé dans diméthylformamidine (DMF) en présence de Disopropyléthylamine (DIEA, 2 eq) est ajouté le N-hydroxy-Succinimidyl-Maleimido-Propionate (SMP, 1 eq dans dissous dans DMF).

35           Le peptide porteur d'une fonction thiol (1,2 eq dans DMF) est ensuite ajouté au mélange réactionnel, et se couple spontanément sur le maléimidopropionate de doxorubicine au cours d'une incubation supplémentaire de 20 minutes.

Le produit de couplage est ensuite purifié sur HPLC préparative, puis lyophilisé.

Chacune des étapes, ainsi que le produit final sont contrôlés par HPLC analytique et spectrométrie de masse.

## 2) Produits testés.

Les produits testés sont rapportés dans le tableau I ci-dessous.

Tableau I

Composé	
No. 1 (Doxo-SynB1)	doxo-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO-RGGRLSYSRRRFSTSTGR
No. 2	doxo-SMP-3MP-rqikiwfgnrrmkwkk

doxo : doxorubicine

CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO : Linker succinate

SMP-3MP : Linker Succinimydyl Maleimido-Propionate-3-MercaptoPropionate

Lettres minuscules : Acides aminés sous forme d.

## 3) Perfusion Cérébrale in situ.

### a) Perfusion.

Il s'agit d'une méthode rapide et sensible pour évaluer la pénétration de divers composés dans le système nerveux central (Takasato et al., 1984, Am. J. Physiol. 247, 484-493 ; Allen et al., 1997, Pharm Res. 14, 337-341). Des rats mâles Sprague-dawley de 2 mois (250-350g, Iffa-Credo ; l'Arbresle, France) sont anesthésiés. Après exposition de la carotide commune, l'artère carotide externe droite est liée au niveau de la bifurcation avec la carotide interne et la carotide commune est liée entre le cœur et le site d'implantation du cathéter (cathéter polyéthylène, ID :0.76). Celui-ci , préalablement rempli par une solution d'héparine (100 unités/ml) est inséré dans la carotide commune. Les rats sont perfusés avec le tampon de perfusion (128 mM NaCl, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4,2 mM KCl, 2,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,9 mM MgSO<sub>4</sub>, et 9 mM D-glucose). Ce tampon est

filtré puis bullé par un mélange contenant 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> afin de maintenir le pH proche de 7,4 et d'alimenter le cerveau en oxygène au cours de la perfusion.

5 Les rats sont perfusés avec le tampon contenant la doxorubicine libre ou les composés No. 1 ou 2. Dans chaque produit la doxorubicine est radiomarkée au carbone 14 (activité spécifique : 9,4 microCi/mg, Amersham, France). Les produits sont perfusés à la concentration de 0,33 microCi/ml ou 0,035 mg/rat.

10 Juste avant le début de la perfusion, le cœur est arrêté par section des ventricules, ceci afin d'éviter au cours de la perfusion un reflux du perfusat. L'hémisphère droit est alors perfusé à une vitesse de 10 ml/min pendant 60 secondes après quoi le rat est  
15 décapité.

b) Rinçage.

Pour les rats subissant l'étape de rinçage, le cathéter préalablement introduit, comme précédemment, dans  
20 la carotide commune est connecté à une vanne à 4 voies opposées (Hamilton, USA) reliée à 2 seringues : l'une contenant le traceur radiomarké (seringue A) et l'autre le tampon seul (seringue B). Une fois le cathéter en place et les connexions correctement réalisées, la cage thoracique  
25 du rat est ouverte et le cœur sectionné. Le contenu de la seringue A est alors immédiatement perfusé au débit de 10 ml/min. Au bout de 60 secondes, le contenu de la seringue B est à son tour injecté au même débit. Après 30 secondes de rinçage, le rat est décapité.

30

c) Dissection du cerveau.

Après décapitation, le cerveau est rapidement prélevé. Ce dernier est disséqué sur la glace en 8 régions :  
35 Hypothalamus (HY), Cortex frontal (CF), Mésencéphale (MS), Cortex Occipital (CO), Cortex Pariétal (CP), Thalamus (TH), Hippocampe (HP), Striatum (ST), qui sont déposées dans des fioles en verre préalablement tarées, puis pesées. Ces structures ainsi que 50 microlitre du perfusat sont digérées pendant 2 heures dans 1 ml de soluène à 60°C. Un cocktail



scintillant (10 ml ; Pico-fluor ; Packard) est ajouté à chacun des échantillons et la quantité de traceurs qu'ils contiennent est mesurée par un double comptage en scintillation liquide (Packard, Tricarb, 1900TR).

5

d) Déplétion capillaire.

10 Cette méthode permet de mesurer la répartition des produits entre le parenchyme cérébral et les cellules endothéliales Triguero et al., 1990, J. Neurochem. 54, 1882-1888). Après 60 secondes de perfusion suivies ou non de 30 secondes de rinçage, l'hémisphère droit est prélevé, débarrassé de ses méninges et plexus choroïdes, puis  
15 homogénéisé dans 3,5 ml de tampon Hepes (en mM : 10 Hepes, 141 NaCl, 4 KCl, 1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,8 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgSO<sub>4</sub> et 10 mM D-glucose, pH = 7.4). Après broyage au potter, 4 ml de solution contenant 4% de Dextran (PM : 76900) sont ajoutés et le mélange vigoureusement agité afin d'obtenir une  
20 concentration finale de 20%. Toutes ces opérations sont réalisées à 4°C en moins de 5 minutes. Après avoir prélevé un échantillon de l'homogénat ainsi obtenu, ce dernier est alors mis à centrifuger pendant 15 min à 5400 g afin de séparer les cellules endothéliales présentes dans le culot  
25 du parenchyme cérébral resté dans le surnageant. Les résultats sont exprimés par les volumes de distribution dans le surnageant et le culot.

4) Injections intraveineuses.

30 Les souris NMRI-nude sont injectées par voie intraveineuse avec le composé No. 1 ou la doxorubicine seule à une dose de 2,5 mg/Kg (équivalent en doxorubicine). La doxorubicine est marquée au carbone 14 (environ 0,5 microCi sont injectés par souris). Après 1, 5, 15, 30, 60, 180,  
35 480, et 1360 minutes, les souris sont sacrifiées. Les organes sont ensuite prélevés et comptés. La quantité de radioactivité dans chaque organe est ensuite exprimée en quantité de produit par gramme d'organe. Dans cette étude, nous avons utilisé cinq souris par temps.

Dans le cas du composé No. 2, la souris CD1 est injectée par voie intraveineuse avec le composé No. 2 ou la doxorubicine libre à une dose de 2 mg/Kg (équivalent en doxorubicine). La doxorubicine est marquée au carbone 14 (environ 3 microCi sont injectés par souris). Après des temps 15 minutes, 2 heures et 8 heures, la souris est sacrifiée et la quantité de produit dans chaque organe est analysée par la technique " Whole-body autoradiography ". La quantité de radioactivité dans chaque organe est ensuite exprimée en quantité de produit par gramme d'organe. Dans cette expérience, nous avons utilisé une souris par groupe.

## II - RÉSULTATS.

### 1) Perfusion Cérébrale in situ.

#### a) Tolérance des produits.

Dans un premier temps, l'effet des produits testés sur l'intégrité de la BHE a été observé, grâce au volume de distribution du [<sup>3</sup>H]-sucrose, qui est une petite molécule ne pénétrant pas dans le système nerveux central pour des temps d'exposition courts. On estime que ce volume ne doit pas excéder 18 µg/ml. Au delà, on conclut à une perméabilité anormale de la BHE.

La doxorubicine, les composés No. 1 et 2 ont été injectés en présence du sucrose et l'intégrité de la BHE est mesurée. Le tableau II ci-dessous rapporte l'effet de la perfusion des produits sur l'intégrité de la BHE.

Tableau II

Composé	Dose perfusée	Etat de la BHE
doxorubicine	0,07 mg	Intègre
No. 1	0,05 mg	Intègre
(Doxo-SynB1)	0,8 mg	Intègre
No. 2	0,05 mg	Intègre
	0,2 mg	Intègre
	0,8 mg	Anormal

Le composé No. 1 ne provoque pas d'ouverture anormale de la BHE même à des doses de 0,8 mg. Par contre le composé No. 2, il y a une ouverture de la BHE à des doses

supérieures à 0,2 mg. Par conséquent, les travaux ont été réalisés avec des produits à des doses de 0,05 mg.

b) Pénétration des Produits.

5 Cette étude a consisté à comparer la pénétration dans la BHE de la doxorubicine seule avec la doxorubicine vectorisée dans les composés No. 1 et 2. Après 60 secondes de perfusion dans le tampon, la pénétration des produits est estimée par la constante d'influx ou  $K_{in}$  en microl/sec/g. 10 La figure 3 représente la pénétration des produits dans le cerveau. On observe que la vectorisation de la doxorubicine par les deux vecteurs augmente son passage dans le cerveau de 5 à 7 fois après une perfusion de 60 secondes dans du tampon.

15 Dans une autre expérience, le cerveau a été disséqué en 8 régions comme décrit précédemment et la quantité de produit dans chaque région a été mesurée. La figure 4 en annexe rapporte la pénétration de ces produits dans le cerveau. On observe que la pénétration des composés 20 No. 1 et 2 est 5 à 7 fois supérieure à celle de la doxorubicine libre et ce, quelle que soit les structures cérébrales considérées.

c) Pénétration des produits après rinçage.

25 Le rinçage des capillaires cérébraux par perfusion de tampon sans traceur pendant 30 secondes permet d'éliminer la fraction du produit étudié éventuellement adhérente à la membrane luminale des cellules endothéliales. La figure 5 en annexe rapporte les résultats de la 30 pénétration des produits après rinçage. On observe pour la doxorubicine libre une diminution de la constante d'influx de 25% environ. Pour la doxorubicine vectorisée, cette diminution est de 45% pour le composé No.1 et de 10% pour le composé No. 2. Finalement, la pénétration des composés 35 No. 1 et 2 est respectivement augmentée de 4 et 7 fois par rapport à la doxorubicine libre.

d) Répartition des produits après déplétion capillaire.

Cette méthode permet de mesurer la répartition des produits entre le parenchyme cérébral et les cellules endothéliales. La déplétion capillaire est effectuée après perfusion de 60 secondes suivie d'un rinçage de 30 secondes. Les volumes de distribution (Vd) dans les cellules endothéliales et le parenchyme cérébral sont exprimés en microlitre/g.

La figure 6 en annexe indique la répartition des produits après déplétion capillaire. On observe pour la doxorubicine libre un Vd dans le parenchyme cérébral de 1,75 µl/g, pour le composé No. 1 un Vd de 28,5 µl/g et pour le composé No.2 un Vd de 29,5 µl/g. Ces résultats montrent que la pénétration de la doxorubicine vectorisée (composés No. 1 et 2) dans le parenchyme cérébral est considérablement augmentée par rapport à celle de la doxorubicine libre. On retrouve environ 60% des composés No. 1 et 2 dans le parenchyme cérébral 1 minute après la perfusion cérébrale des molécules suivie de 30 secondes de rinçage des capillaires cérébraux.

## 2) Injection intraveineuse.

L'étude du passage d'une substance au travers de la BHE nécessite l'emploi de plusieurs approches complémentaires. La perfusion cérébrale permet des mesures sur des temps très courts. L'injection intraveineuse permet une évaluation globale des pharmacocinétiques chez l'animal sur des temps longs. La molécule radioactive est introduite dans la circulation sanguine et se distribue dans l'organisme. Une certaine quantité de cette molécule pénètre dans le cerveau où elle est mesurée à des temps déterminés.

### a) Avec le composé No. 1.

Après injection en intraveineuse du composé No. 1, les souris nude sont sacrifiées à différents temps et la radioactivité totale dans le cerveau est comptée et exprimée en quantité de produit par gramme de cerveau. Le tableau III ci-dessous indique la quantité de doxorubicine et de composé No. 1 dans le cerveau.

Tableau III

Groupe	Produit	Dose (mg baseDXR/Kg)	Temps (min)	Quantité de produit (microg/g cerveau)
1	doxorubicine	2,5	1	0,14
			5	0,05
			15	0,04
			30	0,05
			60	0,04
			180	0,03
			480	0,04
			1360	0,01
2	Composé No.1	2,5	1	0,48
			5	0,18
			15	0,42
			30	0,25
			60	0,12
			180	0,03
			480	0,02
			1360	0,01

5 La vectorisation a permis d'améliorer de façon significative le passage de la doxorubicine à travers la barrière hémato-encéphalique. Cette accumulation est observée non seulement pour des temps courts mais aussi pour des temps longs allant jusqu'à 3 heure post-administration. Le tableau IV ci-dessous indique le rapport de la doxorubicine vectorisée (composé No. 1) par rapport à la doxorubicine seule.

10

Tableau IV

Temps (min)	Rapport Composé No. 1 / doxorubicine
1	3,4
5	3,6
15	10,5
30	5
60	3
180	1

b) Avec le composé No. 2.

15 Après injection intraveineuse du composé No. 2, les souris CD-1 sont sacrifiées après des temps de 15 minutes, 2 heures et 8 heures. La radioactivité totale dans le cerveau est analysée par la méthode "Whole body autoradiography" et exprimée en quantité de produit par gramme de cerveau. La tableau V ci-dessous indique la

20 quantité de doxorubicine et de coposé No. 2 dans le cerveau.

Tableau V

Groupe	Produit	Dose (mg baseDXR/Kg)	Temps (min)	Quantité de produit (ug/g cerveau)
1	doxorubicine	2	15	1,24
			120	0,98
			480	0,67
2	Composé No.2	2	15	9,49
			120	4,73
			480	4,52

5 La vectorisation a permis d'améliorer de façon  
significative le passage de la doxorubicine à travers la  
barrière hémato-encéphalique. Cette accumulation est  
observée pour des temps longs allant jusqu'à 8 heures post-  
administration. Le tableau VI ci-dessous représente le  
10 rapport de la doxorubicine vectorisée (composé No. 2) par  
rapport à la doxorubicine seule.

Tableau VI

Temps (min)	Rapport Composé No. 2 / doxorubicine
15	7,65
120	4,83
480	6,75

#### Exemple II : Pénétration de la dalargine.

15

##### 1) Produits testés.

Les produits testés dans cet exemple sont  
rapportés dans le tableau VII ci-dessous.

Tableau VII

20

composé	
3 : dalargine	Y-(D)A-GFLR
4 : dal-SynB1	Y-(D)A-GFLR-S-S-RGGRLSYSRRRFSTSTGR

dal : dalargine

S-S : Linker dissulfide

(D) : acide aminé en forme d.

25

##### 2) Pénétration des Produits.

Cette étude a consisté à comparer la pénétration  
dans la BHE de la dalargine seule avec la dalargine  
vectorisée. La dalargine est un peptide analgésique. La

dalargine a été liée par un pont dissulfure au peptide vecteur du tableau VII. Cette forme de liaison hydrolysable a été retenu car il a été démontré dans la littérature que ces ponts dissulfures sont stables dans le plasma mais dès que le produit passe la BHE, le pont est hydrolysé libérant ainsi la drogue.

Après 60 secondes de perfusion dans le tampon, la pénétration des produits est estimée par la constante d'influx ou  $K_{in}$  en  $\mu l/sec/g$ . La figure 7 montre que la vectorisation de la dalargine par le peptide vecteur SynB1 augmente considérablement son passage dans le cerveau après une perfusion de 60 secondes dans du tampon.

### 3) Activité Biologique.

Dans le cadre de cette étude, l'activité biologique de la dalargine seule a été comparée à l'activité biologique de la dalargine vectorisée avec SynB1. A cet effet, le modèle « Hot Plate » chez la souris a été utilisé. Dans ce modèle, la souris est placée sur une plaque chauffante et le temps que la souris met pour réagir à la chaleur est mesuré « temps de latence ».

Il a été injecté aux souris par voie intraveineuse 2 mg/Kg de chaque produit (la dose correspondant à la quantité de dalargine). Après des temps variant de 0 à 90 minutes, le temps de latence a été mesuré. La figure 8 montre qu'après l'injection de la dalargine seule, aucun effet n'est obtenu. Le temps de latence est constant. Par contre quand la dalargine vectorisée est injectée, on observe une augmentation de temps de latence surtout pour des temps allant de 5 à 30 minutes après administration du produit. Par exemple, 5 minutes après injection, le temps de latence de la dalargine vectorisée est de 22,75 sec alors que pour la dalargine seule, il n'est que de 7,6 sec. Ceci indique clairement qu'il y a augmentation de l'activité analgésique de la dalargine vectorisée.

Il a également été vérifié que cet effet n'est pas dû au peptide tout seul. Pour cela, le vecteur SynB1

seul a été injecté et le temps de latence a été mesuré. Les résultats sont comparables à ceux de la dalargine seule, indiquant que le vecteur seul n'a aucune activité analgésique.

5

Exemple III : Pénétration de la doxorubicine.

Cet exemple concerne un autre peptide vecteur que celui de l'exemple 1.

10

1) Produits testés.

Les produits testés dans cet exemple sont rapportés dans le tableau VIII ci-dessous.

Tableau VIII

Composé	
doxo	doxorubicine
N°5 : doxo-SynB 3	doxo-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO- RRLSYSRRRF

15

Doxo : doxorubicine

CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO : Linker succinate

2) Pénétration des Produits.

20

Cette étude a consisté à comparer la pénétration dans la BHE de la doxorubicine seule avec la doxorubicine vectorisée. Après 60 secondes de perfusion dans le tampon, la pénétration des produits est estimée par la constante d'influx ou Kin en µl/sec/g. La figure 9 montre que la vectorisation de la doxorubicine par le vecteur SynB3 augmente son passage dans le cerveau de 5 fois après une perfusion de 60 secondes dans du tampon.

25

30

Dans une autre expérience, le cerveau a été disséqué en 6 régions comme décrit ci-dessus et la quantité de produit dans chaque région a été mesurée. La figure 10 montre une pénétration du composé N°2 supérieure à celle de la doxorubicine libre et ce, quelle que soit les structures cérébrales considérées.



3) Répartition des produits après déplétion capillaire.

Cette méthode permet de mesurer la répartition des produits entre le parenchyme cérébral et les cellules endothéliales. La déplétion capillaire est effectuée après perfusion de 60 secondes suivie d'un rinçage de 30 secondes. Les volumes de distribution (Vd) dans les cellules endothéliales et le parenchyme cérébral sont exprimés en  $\mu\text{l/g}$ .

On observe sur la figure 11 pour la doxorubicine libre un Vd dans le parenchyme cérébral de  $1,75 \mu\text{l/g}$ , et un Vd de  $98,32 \mu\text{l/g}$  et pour la doxorubicine vectorisée. Ceci indique que la pénétration de la doxorubicine vectorisée dans le parenchyme cérébral est considérablement augmentée 50 fois par rapport à celle de la doxorubicine libre.

Exemple IV : Pénétration de la pénicilline.

1) Produits testés.

Les produits testés dans cet exemple sont rapportés dans le tableau VII ci-dessous.

Tableau IX

Composé	
PNC	benzylpenicilline
N°6 : PNC-SynB1	PNC-linker-RGGRLSYSRRRFSTSTGR

Le schéma du couplage de la benzylpénicilline avec le vecteur SynB1 est représenté dans la figure 12. La N-benzyl pénicilline (NBP) a été couplée au vecteur SynB1 par l'intermédiaire d'un maillon glycolamidique. Dans une première étape, le carboxylate libre de NBP est couplé par liaison ester sur le bromo-acétate de trichlorophénol. Le vecteur est ensuite couplé par liaison amide sur son extrémité N-terminale, avec départ de trichlorophénol. Le produit de couplage est purifié par chromatographie sur phase réverse puis lyophilisé.

## 2) Pénétration des Produits.

La pénétration dans la BHE de la benzylpénicilline seule a été comparée celle de avec la benzylpénicilline vectorisée (composé N°6). Après 60 secondes de perfusion dans le tampon, la pénétration des produits radiomarqués est estimée par la constante d'influx ou  $K_{in}$  en  $\mu\text{l/sec/g}$ . La figure 13 montre que la vectorisation de la pénicilline par le vecteur augmente son passage dans le cerveau d'environ 9 fois après une perfusion de 60 secondes dans du tampon.

Dans une autre expérience, après 30 secondes de perfusion dans le tampon, le cerveau a été disséqué en plusieurs régions comme décrit précédemment et la quantité de produit dans chaque région a été mesurée. La figure 14 montre qu'on observe une pénétration du composé N°6, six à quatorze fois supérieure à celle de la pénicilline libre et ce, dépendant de la structure cérébrale considérée.

## 3) Répartition des produits après déplétion capillaire.

Cette méthode permet de mesurer la répartition des produits entre le parenchyme cérébral et les cellules endothéliales. La déplétion capillaire est effectuée après perfusion de 30 secondes suivie d'un rinçage de 30 secondes. Les volumes de distribution ( $V_d$ ) dans les cellules endothéliales et le parenchyme cérébral sont exprimés en  $\mu\text{l/g}$ .

On observe sur la figure 15, pour la benzylpénicilline libre un  $V_d$  dans le parenchyme cérébral de  $3,94 \mu\text{l/g}$  et un  $V_d$  de  $25,76 \mu\text{l/g}$  pour la benzylpénicilline vectorisée. Ceci indique que la pénétration de la benzylpénicilline vectorisée dans le parenchyme cérébral est considérablement augmentée par rapport à celle de la benzylpénicilline libre.

## REVENDEICATIONS

- 5 1) Utilisation d'un peptide linéaire couplé à une substance active en diagnostic ou thérapie d'une affection du SNC pour la préparation d'un médicament capable de traverser le barrière hématoencéphalique à utiliser en diagnostic ou thérapie d'une affection localisée au niveau du SNC, ledit peptide répondant à l'une des formules (I),  
10 (II) ou (III) suivantes :
- $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}$  (I)  
dans laquelle formule (I), les résidus  $X_1$  à  $X_{16}$  sont des résidus d'acides aminés dont 6 à 10 d'entre-eux sont des acides aminés hydrophobes et  $X_6$  est le tryptophane,  
15 BXXBXXXXBBBXXXXXXB (II)  
BXXBXXXXBXXXXBBXB (III),  
dans lesquelles formules (II) et (III) :
- les groupes B, identiques ou différents, représentent un résidus d'acide aminé dont la chaîne latérale porte un groupement basique, et  
20 - les groupes X, identiques ou différents, représentent un résidus d'acide aminé aliphatique ou aromatique,
- ou lesdits peptides de formules (I), (II), (III)  
25 sous forme rétro, constitués d'acides aminés de configuration D et/ou L, ou un fragment de ceux-ci constitué d'une séquence d'au moins 5 et de préférence d'au moins 7 acides aminés successifs des peptides de formules (I), (II) ou (III).
- 30
- 2) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que dans le peptide de formule (I), les acides aminés hydrophobes sont l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, le  
35 tryptophane, la tyrosine et la méthionine, et les autres acides aminés sont des acides aminés :
- non-hydrophobes qui peuvent être des acides aminés non polaire comme la glycine, ou polaires comme la

sérine, la thréonine, la cystéine, l'asparagine, la glutamine, ou

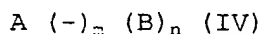
- acides (acide aspartique ou glutamique), ou
- basiques (lysine, arginine ou histidine), ou
- une association d'acides aminés de ces trois catégories.

3) Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que le peptide de formule (I) comprend 6 acides aminés hydrophobes et 10 acides aminés non-hydrophobes.

4) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que dans les peptides de formule (II) ou (III) :

- B est choisi parmi l'arginine, la lysine, l'acide diaminoacétique, l'acide diaminobutyrique, l'acide diaminopropionique, l'ornithine, et
- X est choisi parmi la glycine, l'alanine, la valine, la norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la cystéine<sup>Ac<sup>m</sup></sup>, la penicillamine, la méthionine, le serine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la phénylalanine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine, la proline, l'Abu, l'acide amino-1-cyclohexane carboxylique, l'Aib, la 2-aminotétraline carboxylique, la 4-bromophénylalanine, tert-Leucine, la 4-chlorophénylalanine, la bêta-cyclohexyalanine, la 3,4-dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine, l'homoleucine, la bêta-homoleucine, l'homophénylalanine, la 4-méthylphénylalanine, la 1-naphtyalanine, la 2-naphtyalanine, la 4-nitrophénylalanine, la 3-nitrotyrosine, la norvaline, la phénylglycine, la 3-pyridyalanine, la [2-thiényl]alanine.

5) Utilisation de composés répondant à la formule (IV) suivante :



dans laquelle

- A représente un peptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 4,

- B représente une substance active en diagnostic ou thérapie d'une affection du SNC,

5 - n est 1 ou plus, et de préférence jusqu'à 10 avantageusement jusqu'à 5,

-  $(-)_m$  représente la liaison, ou linker, entre A et B, où m est 1 ou plus, et de préférence jusqu'à 10 avantageusement jusqu'à 5,

10 pour la préparation d'un médicament capable de traverser la barrière hématoencéphalique à utiliser en diagnostic ou thérapie d'une affection localisée au niveau du SNC.

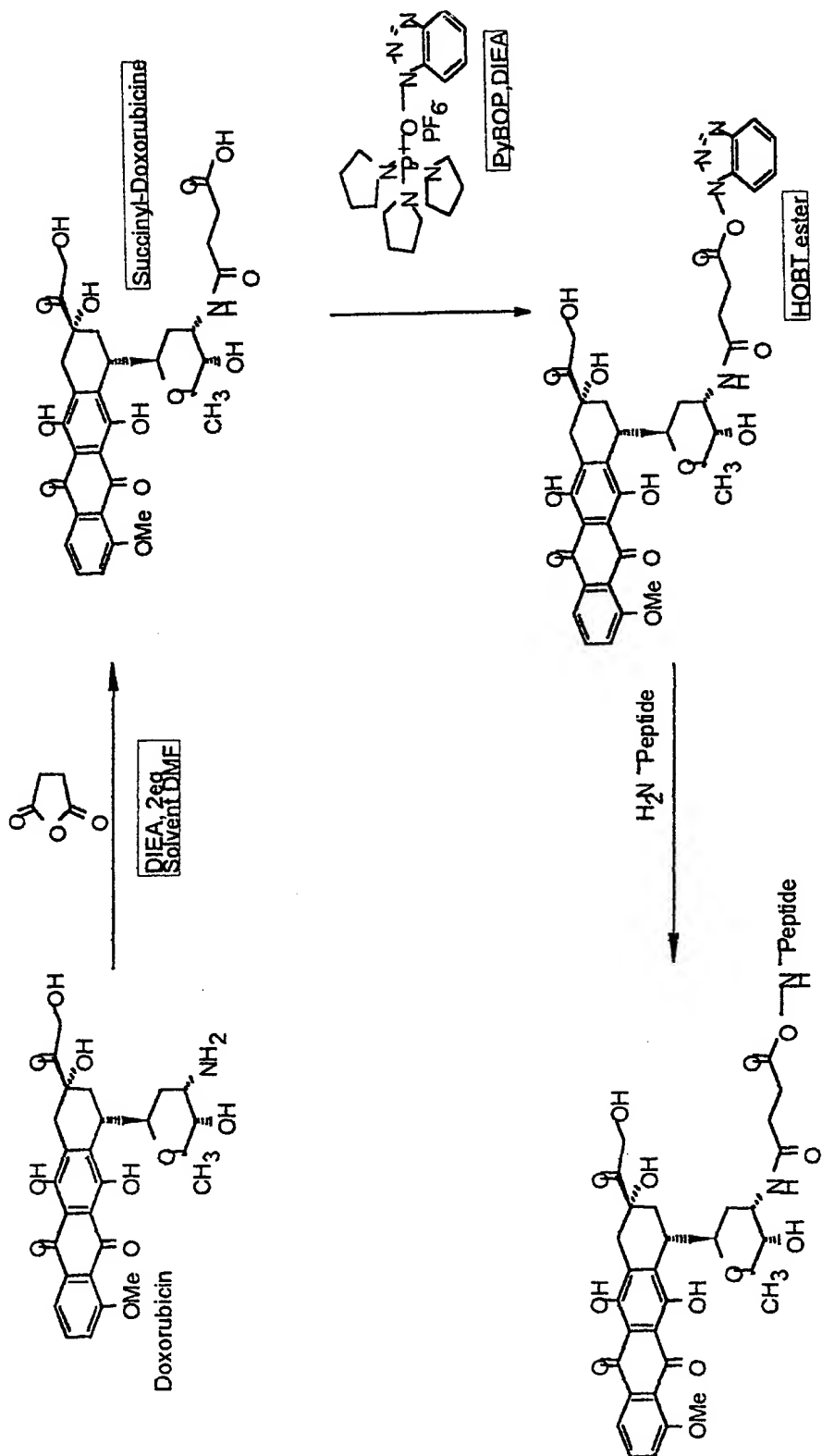
15 6) Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que dans la formule (IV) la liaison  $(-)_m$  entre A et B est une liaison covalente, hydrophobe ou ionique, clivable ou non-clivable dans les milieux physiologiques ou à l'intérieur de la cellules, ou un mélange de celles-ci.

20

7) Utilisation selon l'une des revendications 5 ou 6, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'une affection choisie  
25 parmi : les cancers du cerveau, la maladie d'Alzeihmer, la maladie de Parkinson, la dépression, la douleur, les méningites.

1/15

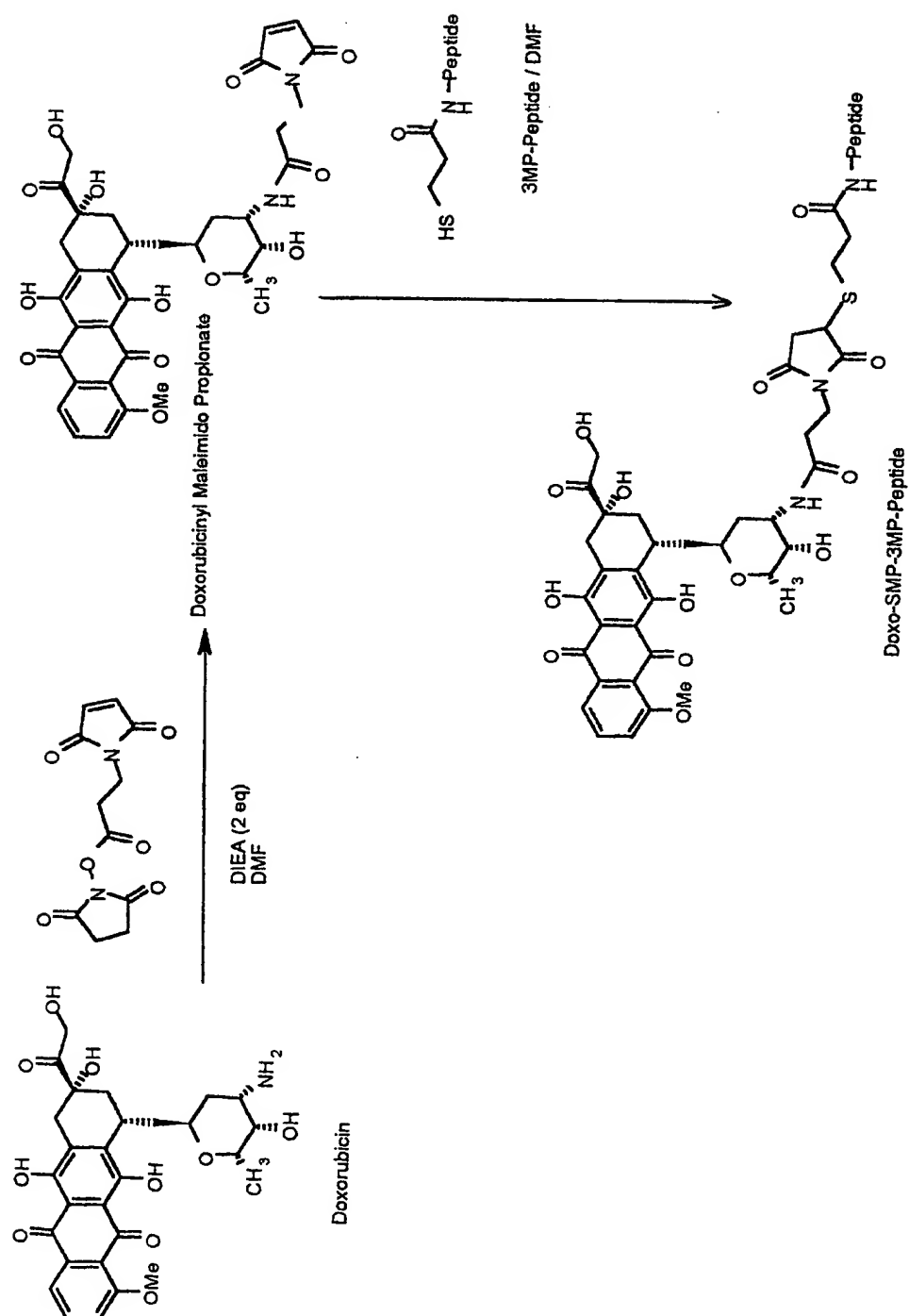
Fig. 1 : Préparation de doxorubicine-Succ-peptides



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

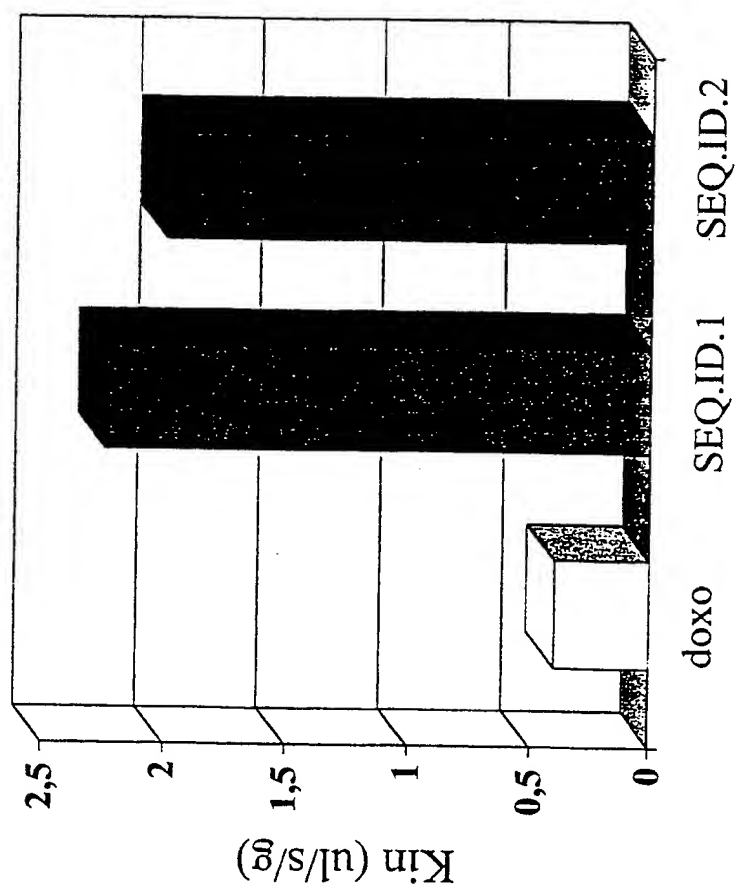
2/15

Fig.2



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

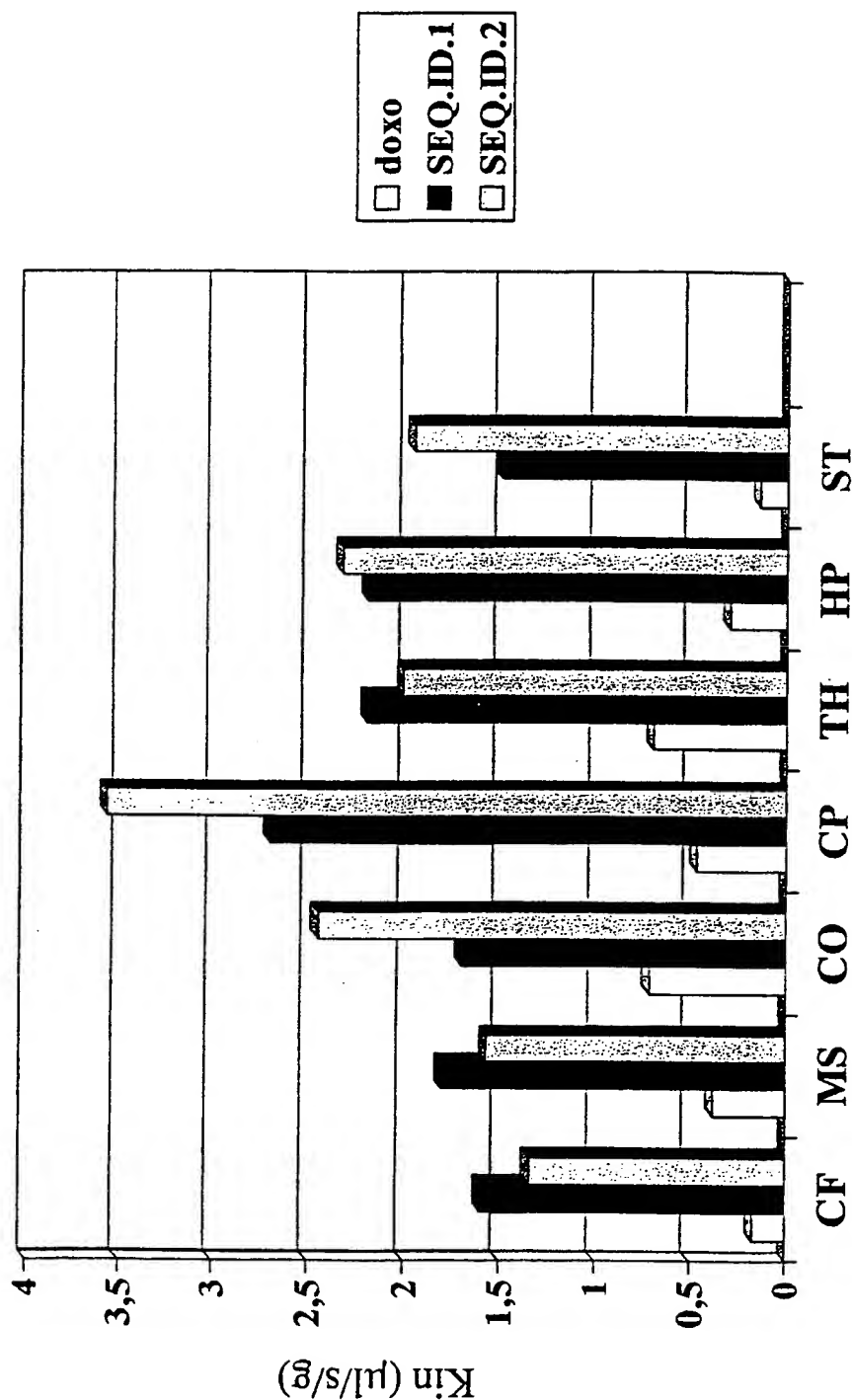
Figure 3: Pénétration des produits dans le cerveau





4/15

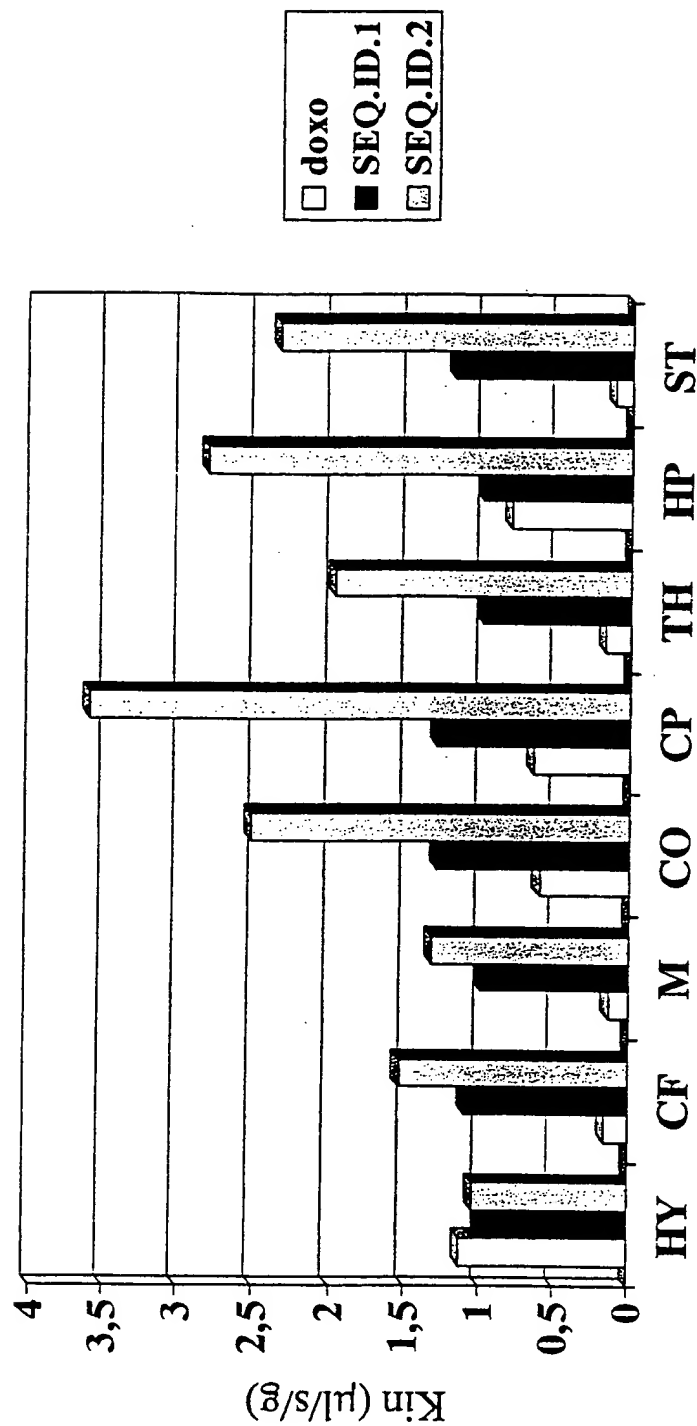
Figure 4: Répartition des produits dans les structures cérébrales



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

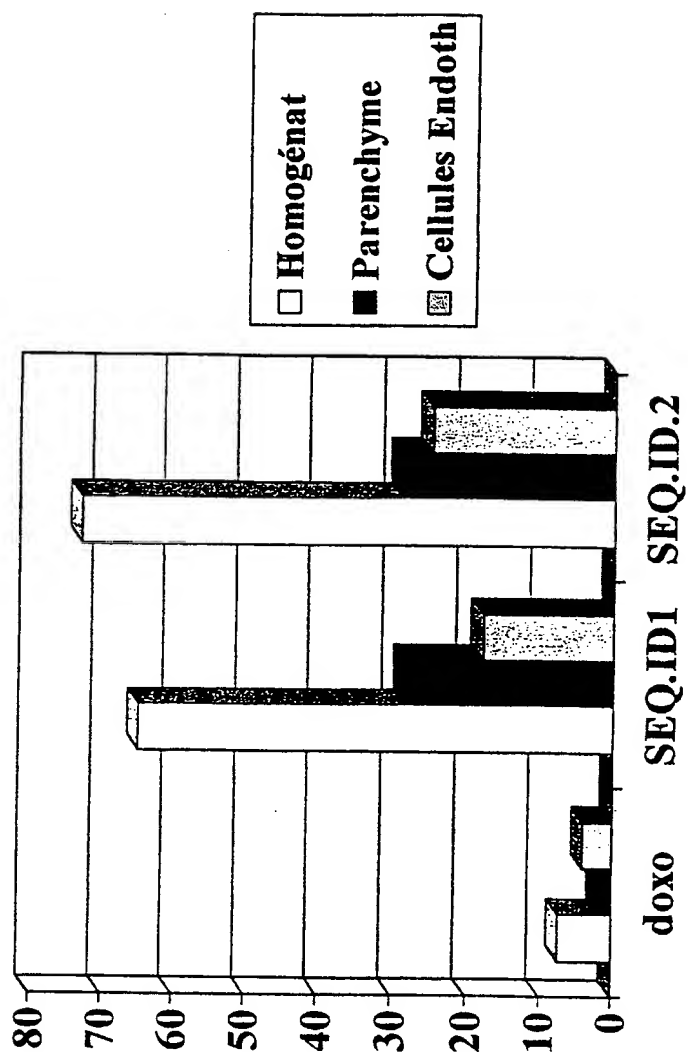
5/15

Figure 5: Pénétration des produits après rinçage



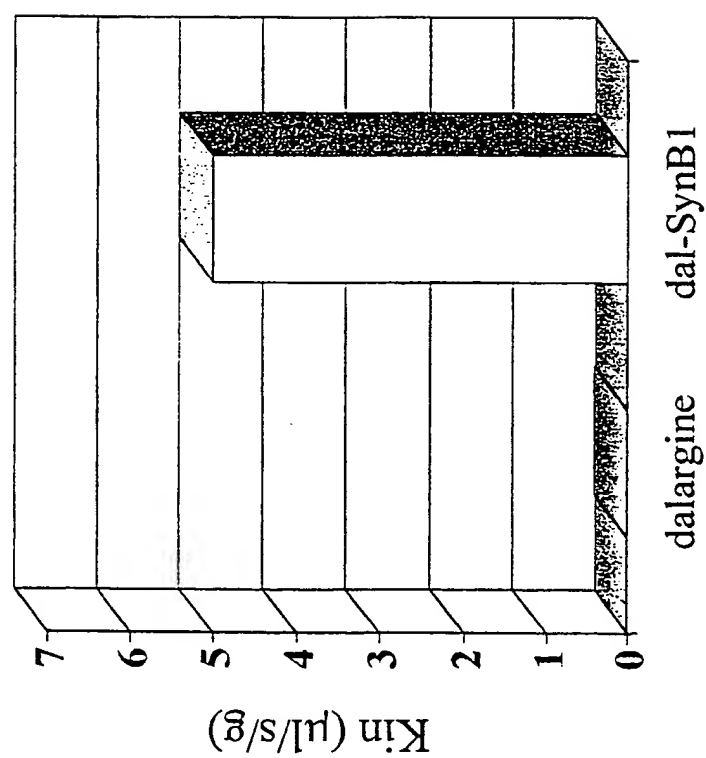
6/15

Figure 6: Répartition des produits après déplétion capillaire



7/15

Figure 7: Pénétration de la dalargine dans le cerveau



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

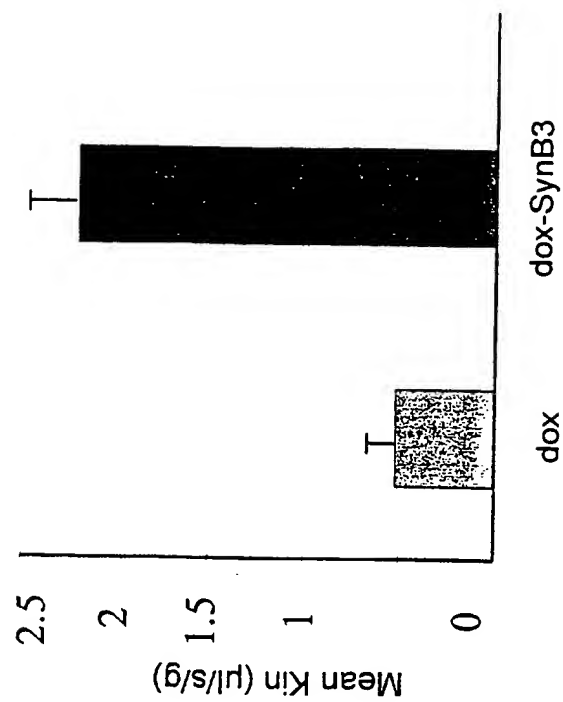
8/15

Figure 8 : Activité analgésique de la dalargine vectorisée

Group	Latence (sec)						
	0min	5min	10min	15min	30min	45min	90min
Dalargin	4	7.6	5.1	5.6	4.8	5.6	5.3
Dal-SynB1	5	22.75	14.75	13.25	7.75	4	5.5
SynB1	6.1	6.8	7.5	5.5	4.67	5	5.17

9/15

Figure 9: Pénétration des produits dans le cerveau



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

10/15

Figure 10: Répartition des produits dans les structures cérébrales

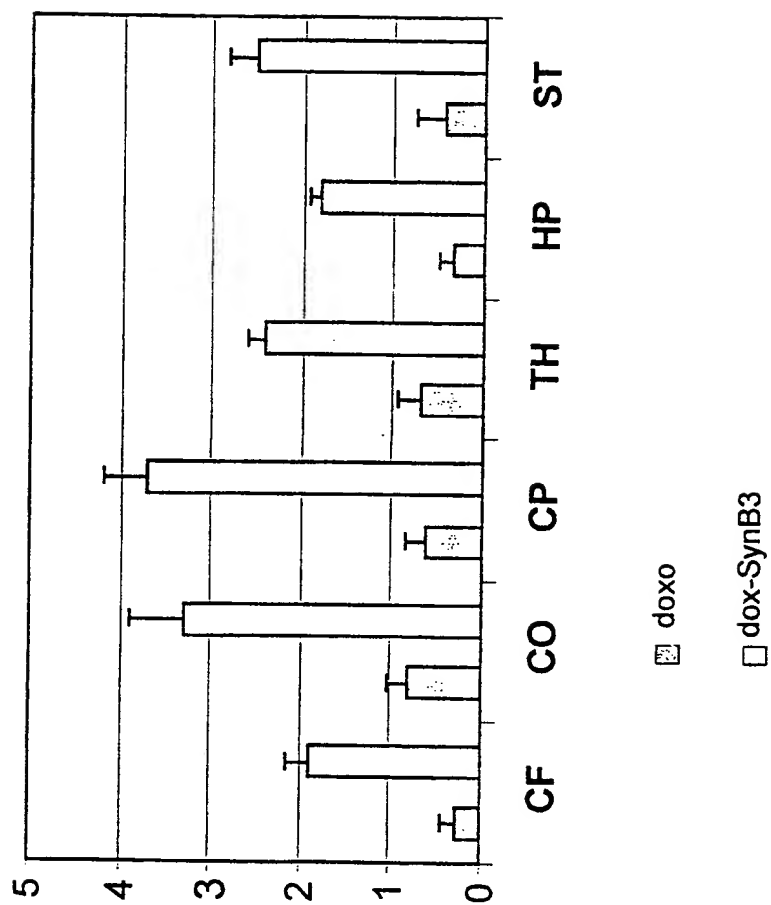
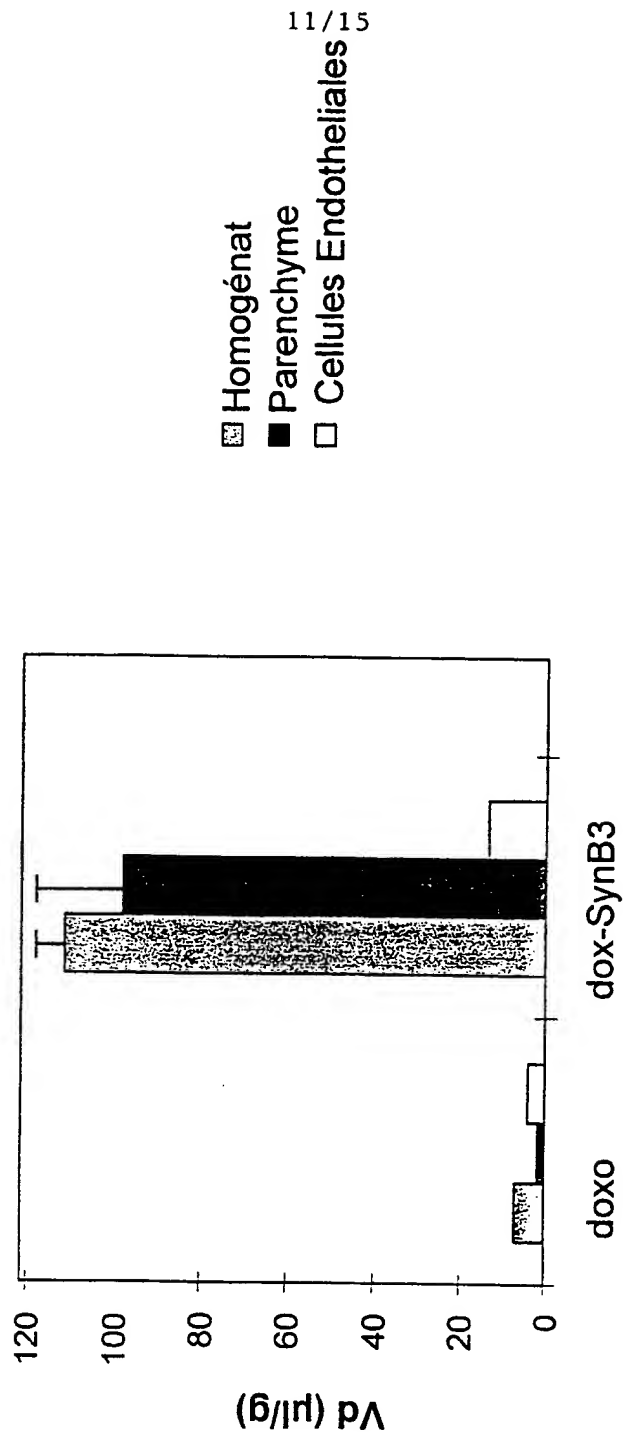


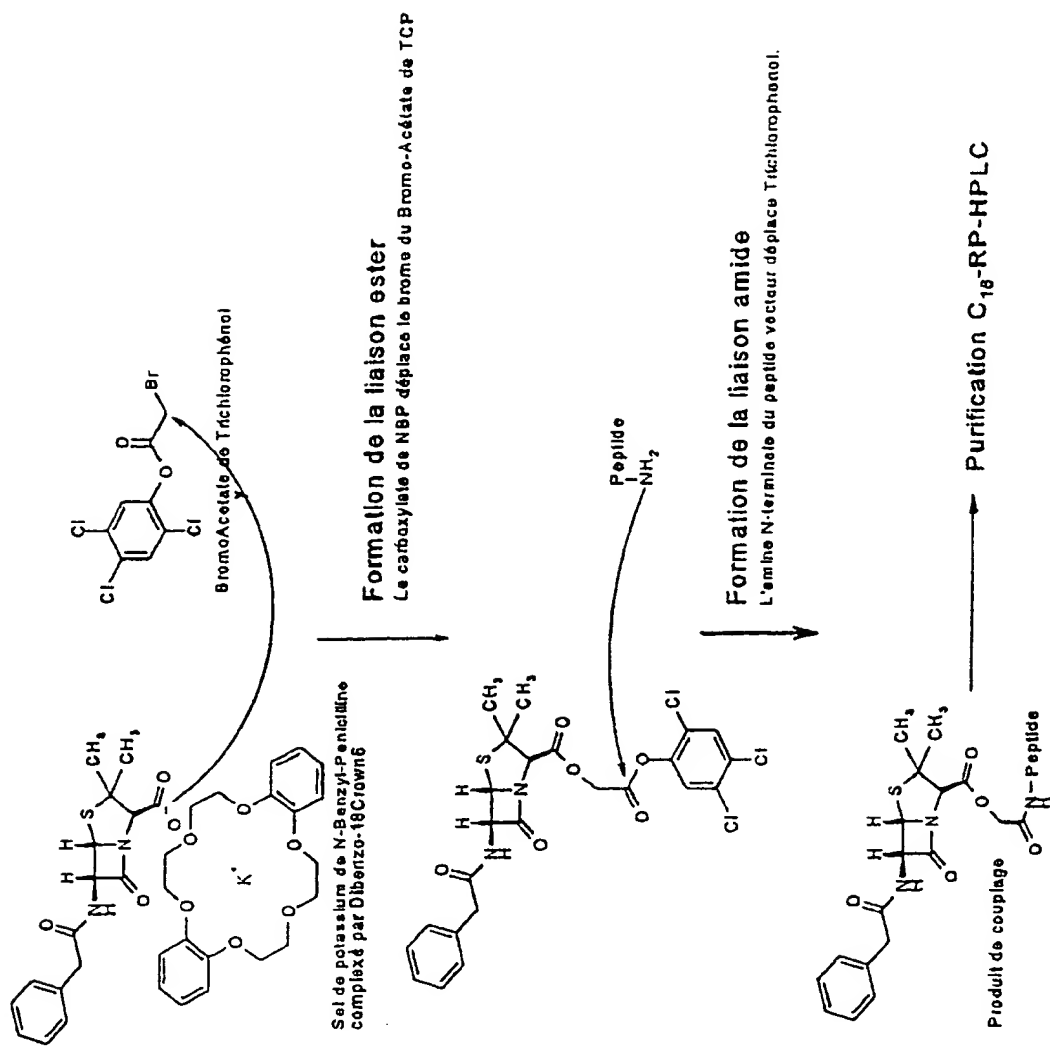
Figure 11: Répartition des produits après déplétion capillaire





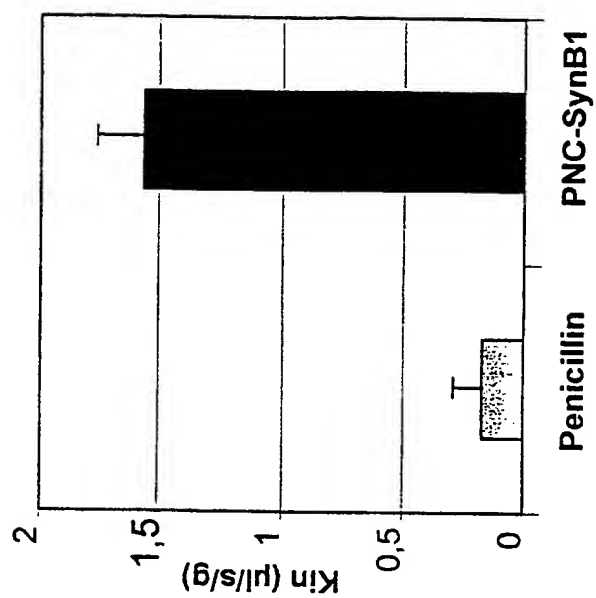
12/15

Figure 12: Synthèse de N-Benzyl-Pénicilline-SynB1



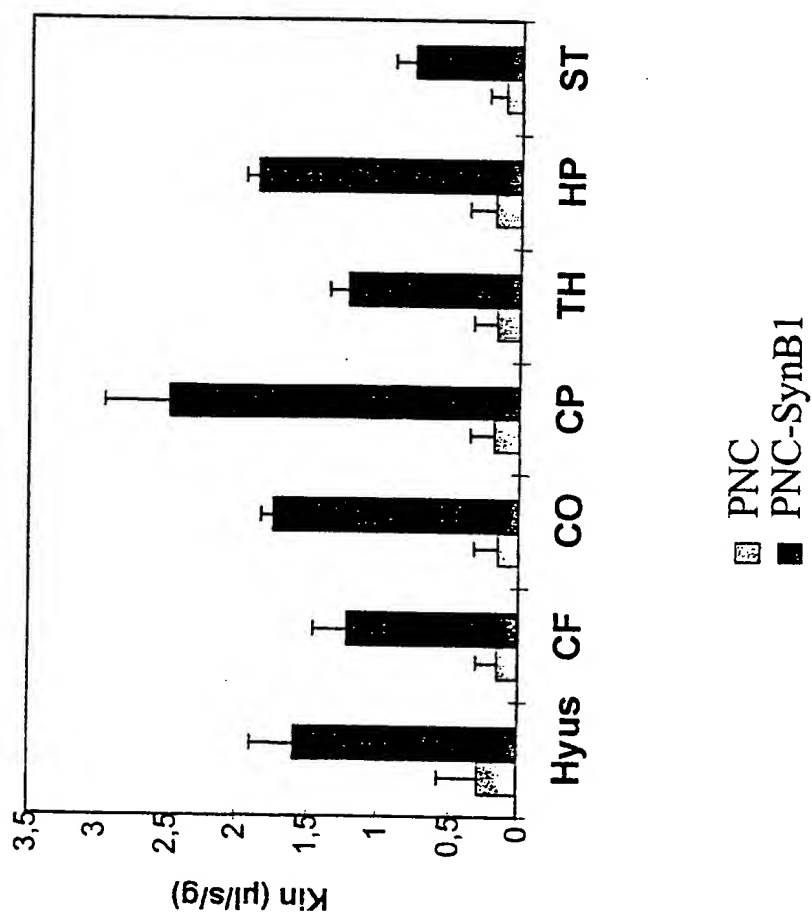
13/15

Figure 13: pénétration de la Pénicilline dans le cerveau



14/15

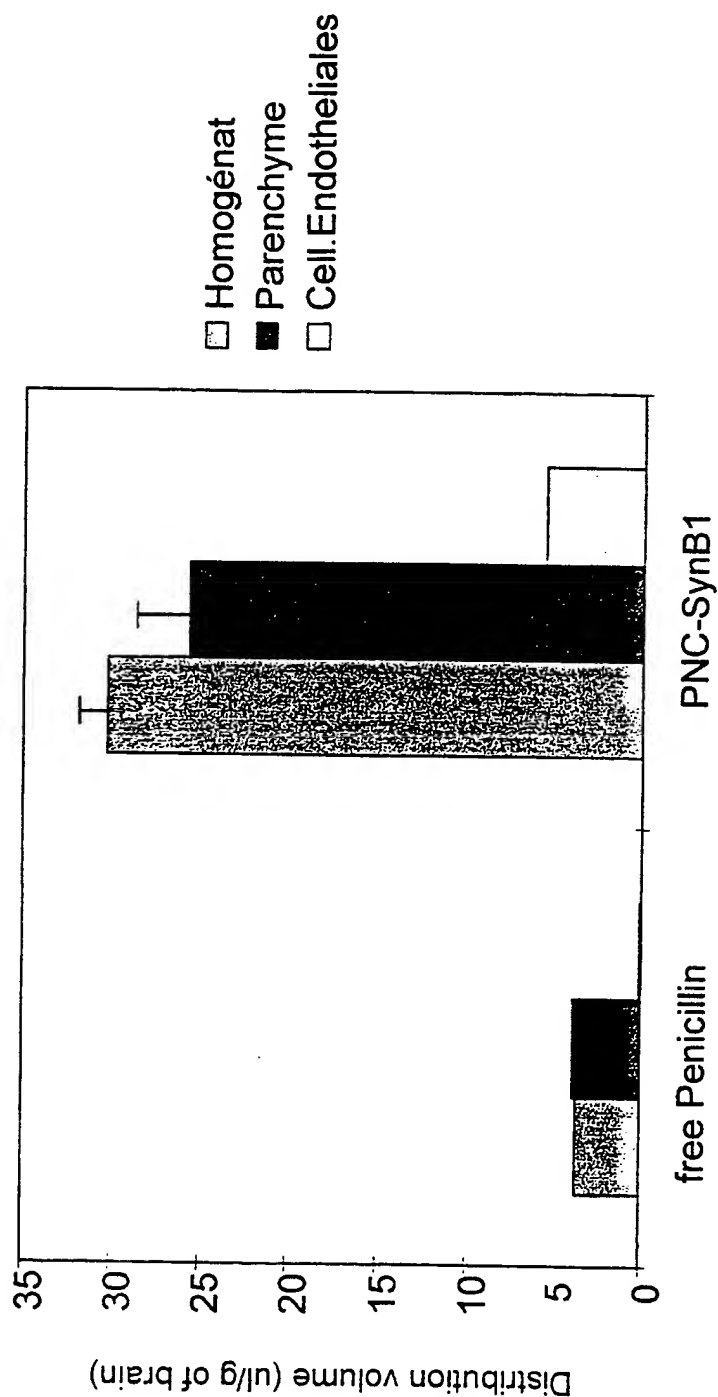
Figure 14: répartition des produits dans les structures cérébrales



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

15/15

Figure 15: répartition des produits après déplétion capillaire



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02938

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 99 07728 A (CALAS BERNARD ;GRASSY GERARD (FR); SYNT EM S A (FR); CHAVANIEU ALA) 18 February 1999 (1999-02-18) cited in the application page 18, line 7 - line 21; claims ---	1-7
X	WO 97 12912 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ;CHASSAING GERARD (FR); PROCHIAITZ ALAIN (F) 10 April 1997 (1997-04-10) cited in the application page 2, line 23 - line 26 page 3, line 24 -page 4, line 16; claims 1,6; table I ---	1-7
Y	---	1-7
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 February 2000

Date of mailing of the international search report

10/02/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02938

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DEROSSI D. ET AL: "The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 269, no. 14, 1994, pages 10444-10450, XP002114617 AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD., US ISSN: 0021-9258 cited in the application figure 2	1-7
A	WO 97 19954 A (ASTA MEDICA AG) 5 June 1997 (1997-06-05) claims	
Y	WO 98 46250 A (PIETRAS RICHARD J ; UNIV CALIFORNIA (US)) 22 October 1998 (1998-10-22) *page 156, séquences 34 et 35* claims 1,49	1-7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/FR 99/02938

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
See supplemental sheet INFORMATION FOLLOW-UP PCT/ISA/210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

Continuation of Box I.2

Claims 1-6 of the present application concern a very large variety of compounds. However, a support basis as defined by PCT Article 6 and/or a disclosure as defined by PCT Article 5 can be found for only a very limited number of said claimed compounds. In the present case, the claims are so lacking in support basis and the disclosure of the invention in the description is so limited that it is not possible to carry out a significant search covering the whole claimed spectrum. Consequently, the search was limited to those parts of the claims which are supported and disclosed, namely those parts concerning the compounds, e.g. those prepared in the examples and their close homologues, the compounds mentioned in the description.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02938

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9907728 A	18-02-1999	FR 2767323 A AU 8988998 A	19-02-1999 01-03-1999
WO 9712912 A	10-04-1997	FR 2739621 A EP 0797589 A JP 10510557 T	11-04-1997 01-10-1997 13-10-1998
WO 9719954 A	05-06-1997	US 5843903 A AU 709539 B AU 7572296 A BR 9611647 A CA 2238574 A CN 1202903 A CZ 9801357 A EP 0863917 A NO 982252 A NZ 322054 A PL 326865 A	01-12-1998 02-09-1999 19-06-1997 23-02-1999 05-06-1997 23-12-1998 14-10-1998 16-09-1998 15-05-1998 29-04-1999 26-10-1998
WO 9846250 A	22-10-1998	AU 7127398 A	11-11-1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den...de Internationale No

PCT/FR 99/02938

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 A61K47/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	WO 99 07728 A (CALAS BERNARD ; GRASSY GERARD (FR); SYNT EM S A (FR); CHAVANIEU ALA) 18 février 1999 (1999-02-18) cité dans la demande page 18, ligne 7 - ligne 21; revendications	1-7
X	WO 97 12912 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ; CHASSAING GERARD (FR); PROCHIAITZ ALAIN (F) 10 avril 1997 (1997-04-10) cité dans la demande page 2, ligne 23 - ligne 26 page 3, ligne 24 - page 4, ligne 16; revendications 1,6; tableau I	1-7
Y		1-7
	---	
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"A" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

4 février 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/02/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Berte, M

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. de Internationale No

PCT/FR 99/02938

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	DEROSSI D. ET AL: "The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 269, no. 14, 1994, pages 10444-10450, XP002114617 AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD., US ISSN: 0021-9258 cité dans la demande figure 2	1-7
A	WO 97 19954 A (ASTA MEDICA AG) 5 juin 1997 (1997-06-05) revendications	
Y	WO 98 46250 A (PIETRAS RICHARD J ;UNIV CALIFORNIA (US)) 22 octobre 1998 (1998-10-22) *page 156, séquences 34 et 35* revendications 1,49	1-7

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR 99/ 02938

## Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°s  
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n°s  
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:  
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n°s  
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la première feuille (1)) (Juillet 1998)

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No. PCT/FR 99 02938

### SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Les revendications 1-6 présentes ont trait à une très grande variété de composés. Un fondement au sens de L'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT ne peut cependant être trouvé que pour un nombre très restreint de ces composés revendiqué(e)s. Dans le cas présent, les revendications manquent à un tel point de fondement et l'exposé de l'invention dans la description est si limité qu'une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué est impossible. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est à dire les parties ayant trait aux composés, par ex. ceux préparés dans les exemples et leurs homologues proches, les composés etc mentionnés dans la description.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der. ... de Internationale No

PCT/FR 99/02938

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets	Date de publication
WO 9907728 A	18-02-1999	FR 2767323 A	19-02-1999
		AU 8988998 A	01-03-1999
WO 9712912 A	10-04-1997	FR 2739621 A	11-04-1997
		EP 0797589 A	01-10-1997
		JP 10510557 T	13-10-1998
WO 9719954 A	05-06-1997	US 5843903 A	01-12-1998
		AU 709539 B	02-09-1999
		AU 7572296 A	19-06-1997
		BR 9611647 A	23-02-1999
		CA 2238574 A	05-06-1997
		CN 1202903 A	23-12-1998
		CZ 9801357 A	14-10-1998
		EP 0863917 A	16-09-1998
		NO 982252 A	15-05-1998
		NZ 322054 A	29-04-1999
		PL 326865 A	26-10-1998
WO 9846250 A	22-10-1998	AU 7127398 A	11-11-1998

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)